

25X1

Page Denied

Next 4 Page(s) In Document Denied

Institut für medizinische Mikrobiologie und Immunologie der medizinischen
Fakultät der Karls-Universität in Prag, Vorstand Prof. Dr. med. F. PATOČKA

Das Virus der tschechoslowakischen Zeckenencephalitis im Hühnerembryo

Dimitrij Slonim

Mit 5 Abbildungen im Text

Eingegangen am 10. Oktober 1956

GALLIA, RAMPAS und HOLLENDER (1) waren die ersten, welche die Möglichkeit der Übertragung des von ihnen isolierten Virus der tschechoslowakischen Zeckenencephalitis (T.Z.E.), Stamm HA, auf den Hühnerembryo durch Einimpfung in die Allantoishöhle beschrieben hatten. Die Übertragung auf die Eier beschrieb ferner KREJČÍ (2), später JANDÁSEK, PEŠEK und POSPÍŠIL (3) und BARDOŠ, SOMODSKÁ und FISCHER (4).

Wir legen im folgenden einige von unseren Erfahrungen vor, die wir in den letzten Jahren in der Arbeit mit den Virusarten der T.Z.E. gewonnen haben.

Methodik

1. Die Viren

- a) Virus der T.Z.E., Stamm HA, isoliert im Jahre 1948 von Dr. F. GALLIA, von uns auf die Chorioallantois des Hühnerembryos aus der 45sten Mausgehirnpassage übertragen.
- b) Virus der T.Z.E., Stamm JIR, isoliert im Jahre 1953 in unserem Laboratorium, übertragen auf die Chorioallantois aus der 20sten Mausgehirnpassage.
- c) Virus des Louping-ill, auf die Chorioallantois des Hühnerembryo aus der 40sten Mausgehirnpassage übertragen.
- d) Virus der russischen Frühling-Sommer-Enzephalitis des östlichen Typus, Stamm Sophien, auf die Chorioallantois aus der 60sten Mausgehirnpassage übertragen.

Bei dem Louping-ill-Virus und bei dem der russischen Frühling-Sommer-Enzephalitis ist nur die Zahl der Passagen, welche beide Virusarten in den Laboratorien in der Tschechoslowakei durchmachten, vermerkt; die Zahl und Qualität der Passagen außerhalb unserer Laboratorien sind uns nicht bekannt.

2. Die Hühnerembryonen. Die Embryonen weißer Leghorns, nach Einimpfung inkubiert bei $+36^{\circ}\text{C}$. Für die Einimpfung auf die Chorioallantois wurden 12tägige Embryonen benutzt, für Einimpfung in die Allantoishöhlung 10 bis 11tägige, für Einimpfung in den Dottersack meistens 7–8tägige Embryonen.
3. Die Titration von Virusarten in dem Eimaterial wurde entweder durch die intrazerebrale Impfung von weißen Mäusen, Gewicht 10–13 g (je 0,03 ml), oder durch Einimpfung in den Dottersack von 7–8tägigen Embryonen (je 0,1 ml) durchgeführt. Die Mäuse, an welchen das Material titriert wurde, wurden 14 Tage lang beobachtet, die Embryonen 10 Tage. Die Werte der Infektionstiter wurden wie LD 50 nach REED und MUENCH bestimmt (5).
4. Die Neutralisierungsteste sind nach der allgemein bekannten, auch bei uns beschriebenen Methode ausgeführt worden (6). Das Material für die Inokulation wurde in der Kochsalzlösung (mit 0,01 M Phosphat-Puffer pH 7,4) homogenisiert; bei den Titrationen wurde immer dieselbe Lösung mit Zusatz von 10% Kaninchenserum (bei $+56^{\circ}\text{C}$ 30 Minuten inaktiviert) benutzt.

Die Vermehrung des Virus in dem Hühnerembryo

a) Inokulation auf die Chorioallantois

Stamm HA und JIR des Virus der T.Z.E. aus den Mausgehirnpassagen haben wir auf die Chorioallantois der Hühnerembryonen ohne Schwierigkeiten adaptiert.

In der ersten Passage nach Einimpfung der 0,1 ml Suspension des infizierten Mäusegehirnes (verdünnt auf 10^{-2}), beobachteten wir auf der Chorioallantois, und zwar auch in folgenden Passagen, reproduzierbare Veränderungen.

Am dritten Tage nach der Inokulation zeigt die Chorioallantois eine Verdickung, und kleine Herde, dem Quantum der inokulierten Viruspartikel entsprechend. Man sieht sie als winzige, weißliche Punkte, manchmal ein wenig erhaben über die Chorioallantoisoberfläche. Wenn man das konzentrierte Inokulum (10^{-1}) benutzt, beschränkt sich der Befund oft auf Ödem und Trübung der Membran.

Am dritten Tage nach der Inokulation weisen wir das Virus in der ganzen Chorioallantois, im Embryo, im Dottersack und in der allantoischen und amniotischen Flüssigkeit nach.

Tabelle 1

Tage nach der Inokulation	1	2	3	4	5	6	7
Chorioallantois							
LD 50	$10^{-5,55}$	$10^{-6,25}$	$10^{-7,55}$	$10^{-7,35}$	$10^{-7,35}$	$10^{-5,80}$	$10^{-5,70}$
Embryo LD 50	$10^{-0,35}$	$10^{-4,25}$	$10^{-4,80}$	$10^{-5,25}$	$10^{-5,25}$	$10^{-5,25}$	$10^{-4,70}$

Abbildung 1 und Tabelle 1 zeigen in den LD-50-Werten den Infektionstiter des Virus in der Chorioallantois und im Embryo selbst in verschiedenen Zeitabschnitten nach der Einimpfung. Die Embryonen wurden mit 0,1 ml infizierter Chorioallantoissuspension (JIR E 10) auf der Chorioallantois beimpft; die ursprüngliche LD 50 der benützten Suspension war $10^{-6,5}$; die Suspension wurde auf $10^{-2,0}$ verdünnt. Aus den infizierten Embryonen wurden an jedem Tage 3 Chorioallantois-Membranen und 3 Embryonen zusammen verarbeitet und ihre Titer intrazerebral an Mäusen festgestellt.

Die größte Vermehrung erzielt das Virus in der Chorioallantois am dritten Tage und im Embryo vom vierten Tage an. Weder beim Stamme HA noch

beim Stamme JIR konnten wir in den Chorioallantoispassagen beweisen, daß diese Viren eine ausgeprägte und regelmäßige Fähigkeit hatten, den Embryo zu töten, obwohl wir beide Stämme nicht nur in ihrer 10., 20. und 30. Hühnerembryopassage, sondern den Stamm HA in seiner 40. und Stamm JIR in der 70. Chorioallantoispassage beobachteten. Die meisten Embryonen überleben den 21.-22. Tag der Inkubation, aber die Hühnchen schlüpfen nicht, sie sterben in der Schale ab.

Am siebten Tage nach der Inokulation sind die infizierten Embryonen weniger beweglich und in der Entwicklung zurückgeblieben, ihr Gewicht ist durchschnittlich um 15% niedriger als das von den gleich alten normalen Kontrollembryonen. Etwa bei 10% der infizierten Embryonen (meistens lebenden) fanden wir Ikterus der Fruchtwässer und eine ikterische Leber, welche sich besonders anfällig nach Einlegen in Formalin färbt; der Embryo selbst ist makroskopisch nicht ikterisch.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen ist es möglich, die Virussuspension auf der Chorioallantois durch Zählung der Herde zu titrieren, aber nur im Groben; und das Verfahren ist umständlich. Die Schwierigkeiten sind hier dadurch verursacht, daß es sich um relativ kleine und unregelmäßig sich bildende Herde handelt, die leicht mit den nichtspezifischen verwechselt werden können. Schwierigkeiten ergeben sich für die Zählung der Herde außerdem dadurch, daß sich oft unmittelbar um die primären Herde winzige sekundäre bilden.

b) Inokulation in die Allantoishöhlung

Die Virusarten der T.Z.E. Stamm HA und JIR, auf die Chorioallantois adaptiert, haben wir unmittelbar auf das Hühnerembryo auch durch Einimpfung in die Allantoishöhlung übertragen. Ebenso unmittelbar wurden auch die Mäusegehirnpassagen beider Viren adaptiert.

Tabelle 2

Tage nach der Inokulation	1	2	3	4	5	6
Allantoisflüssigkeit LD 50 . . .	10-4,00	10-4,00	10-4,00	10-3,65	—	10-3,65
Chorioallantois LD 50 . . .	10-4,50	10-6,00	10-6,00	10-6,25	—	10-6,25
Embryo LD 50	10-2,00	10-4,50	10-5,35	10-5,35	—	10-5,35

Abbildung 2 und Tabelle 2 ergeben die Änderungen des Infektionstiters vom Stamme HA in der Allantoisflüssigkeit, Chorioallantois und im Embryo, nach Einimpfung der 21. Chorioallantoispassage von diesem Stamme in die Allantoishöhlung. Die LD-50-Werte sind intrazerebral an Mäusen festgestellt worden.

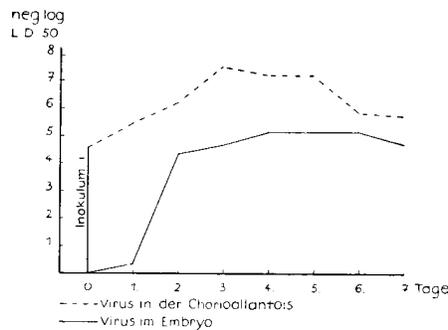


Abb. 1

Stamm HA und Stamm JIR in den Chorioallantoispassagen sowie auch in den Mäusepassagen waren letal für 9–11tägige Embryonen nach Einimpfung in die Allantoishöhlung. Die Embryonen starben am 4.–10. Tag nach der Inokulation ab.

c) Inokulation in den Dottersack

Die Virusstämme HA und JIR sind nach Einimpfung in den Dottersack der 6–8tägigen Hühnerembryonen letal für den Embryo, welcher gewöhnlich am 4.–8. Tage abstirbt. Der Tod der Embryonen ist ein Kriterium für die Vermehrung des Virus, so daß man die Einimpfung in den Dottersack zur Titration des Virus benutzen kann.

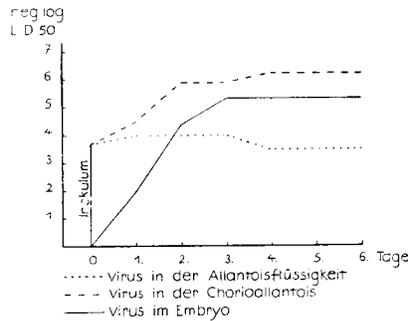


Abb. 2

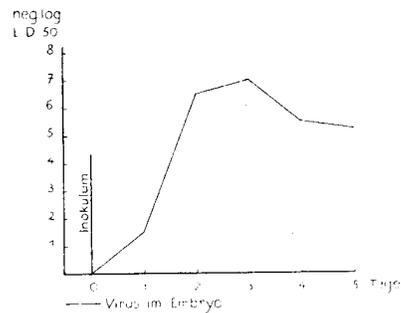


Abb. 3

Tabelle 3

Tage nach der Inokulation	1	2	3	4	5
Embryo LD 50	10 ^{-1,66}	10 ^{-6,66}	10 ^{-7,16}	10 ^{-5,56}	10 ^{-5,22}

Abbildung 3 und Tabelle 3 geben die Dynamik der Vermehrung des Virus im Embryo nach Einimpfung der 10. Chorioallantoispassage (Stamm JIR) in den Dottersack wieder.

Am dritten Tag nach Einimpfung in den Dottersack gewannen wir von 3 Embryonen die Köpfe (ohne Augen) separat von den Körpern (ohne Beine). Aus beiden erzeugten wir gesondert 20%ige Suspensionen und titrierten sie intrazerebral an weißen Mäusen aus. Das Material der Embryonenköpfe enthielt 10^{5,66} LD 50 und das Körpermaterial 10^{6,71} LD 50 des Virus. Das Virus der T.Z.E. vermehrt sich also nicht nur im Gehirn sondern auch in anderen Organen des Hühnerembryos.

Kontrolle der antigenen Stabilität des Virus der T.Z.E. nach Passagen auf der Chorioallantois des Hühnerembryo

Die Virusarten des Stammes HA aus der 3. und 31. und des Stammes JIR aus der 65. Chorioallantoispassage neutralisierten wir gleichzeitig mit den spezifischen Immunsereen, die durch Immunisation der Meerschweinchen mit den Mäusegehirnpassagen der Stämme HA und JIR gewonnen waren.

Tabelle 4

Chorioallantoispassage des Virus	Meerschweinchenimmenserum gegen die Mausgehirnpassage des Virus	
	HA, log NI*	JIR log NI
HA E 3	2,33	2,50
HA E 31	2,49	2,84
JIR E 65	2,10	2,74
Mausgehirnpassage des Virus		
Ha M 54	2,83	2,66
JIR M 20	2,76	2,66

Während der Passagen auf der Chorioallantois kam es zu keinen qualitativen Änderungen der Antigene, die so ausgesprochen gewesen wären, daß wir sie in unserem Versuche hätten nachweisen können. Hühner-Embryonen-Passagen, mögen sie nun aus den ersten oder aus späteren Versuchsreihen stammen, sind praktisch gleicher Weise neutralisiert, genau so wie die Mäuse-Gehirn-Passage beider Virusarten.

Versuch einer Erniedrigung der Invasivität
des Virus der T.Z.E. durch Passage auf der Chorioallantois
des Hühnerembryos

Die Passagen des Virus der T.Z.E. führten wir auf der Chorioallantois der 12tägigen Hühnerembryonen aus, immer mit einem 20%igen Zentrifugat der infektiösen Chorioallantoissuspension der vorherigen Passage. Eine etwaige Änderung der Virusinvasivität durch verschiedene Eier-Passagen versuchten wir durch Bestimmung der Unterschiede der Ergebnisse bei den intrazerebralen und dem peripheren LD-50-Werte zu verfolgen. Wir setzen voraus, daß, wenn es durch die steigende Zahl der Hühner-Embryonen-Passagen zu einer fortschreitenden Herabsetzung der Pathogenität des Virus für die weiße Maus kommen sollte, sich das vor allem bei der peripheren (subkutanen) Inokulation dadurch äußern würde, daß der LD-50-Wert sich in der peripheren Titration erniedrigt. Damit würde der Unterschied zwischen dem intrazerebralen bzw. subkutan festgesetzten Titer des Virus durch eine Zunahme der Eipassagen vergrößert. Ein weiteres Kriterium für die Änderung der Invasivität des auf den Embryo adaptierten Virus wäre für uns die Verlängerung der Inkubationszeit bei solchen Mäusen, die peripher geimpft sind.

Tabelle 5 zeigt, daß es auch nach 70 Passagen nicht gelungen war, wenn konzentriertes Inokulum auf die Chorioallantois gebracht wurde, die Invasivität des Virus der T.Z.E. für Mäuse zu erniedrigen. (Ermittelt wurden die Unterschiede von LD 50 bei intrazerebraler und subkutaner (peripherer) Titration der gehörigen Hühnerembryopassagen des Virus-Stammes JIR.)

Deutlich wurde aber die Verlängerung der Inkubationszeit bei Mäusen, die zur Titration des Virus mit hohen Hühnerembryopassagen benützt waren. Abbildung 4 vergleicht die Inkubationszeiten (d. h. die Zahl der Tage von der

*) log NI = Logarithmus der Neutralisationsindex'

Tabelle 5

Zahl und Sorte der Passagen	LD 50 i.cer.	LD 50 i.perit.	LD 50 s.cut.	LD 50 i.cer. minus LD 50 s.cut.
JIR E 6	10 ^{-6,50}	10 ^{-6,00}	10 ^{-4,66}	1,84
JIR E 10	10 ^{-6,33}	10 ^{-5,77}	10 ^{-5,24}	1,09
JIR E 52	10 ^{-5,66}	10 ^{-4,76}	10 ^{-3,43}	2,23
JIR E 70	10 ^{-5,66}	10 ^{-5,00}	10 ^{-4,33}	1,33
JIR E 73	10 ^{-5,66}	10 ^{-5,00}	10 ^{-4,33}	1,33
JIR M 24	10 ^{-8,00}	10 ^{-7,76}	10 ^{-6,16}	1,84

Inokulation bis zum Tode) von Mäusen, die intrazerebral und subkutan mit der 6. und 70. Chorioallantoispassage des Virus JIR geimpft waren. Sie gibt an, wieviel Prozent von der totalen Menge der Mäuse jeden Tag einging. Bei der intrazerebralen Inokulation ist die Zeit der maximalen Mortalität gleich für die 6. wie die 70. Chorioallantoispassage, d. h. der 7. Tag und die beiden Kurven decken sich mit ihren Höhepunkten. Wenn die Viruspassagen subkutan injiziert werden, kommt es zur Dissociation beider Kurven, weil die maximale Mortalität der Mäuse von der 6. Chorioallantoispassage am 9. Tage liegt, bei der 70. Passage erst am 11. Inkubationstage. Abbildung 5 wiederholt denselben Versuch mit der 10. und 73. Chorioallantoispassage mit gleichem Resultate. Tabelle 6 und 7 ergänzen Abbildung 4 und 5 mit Nummerangaben.

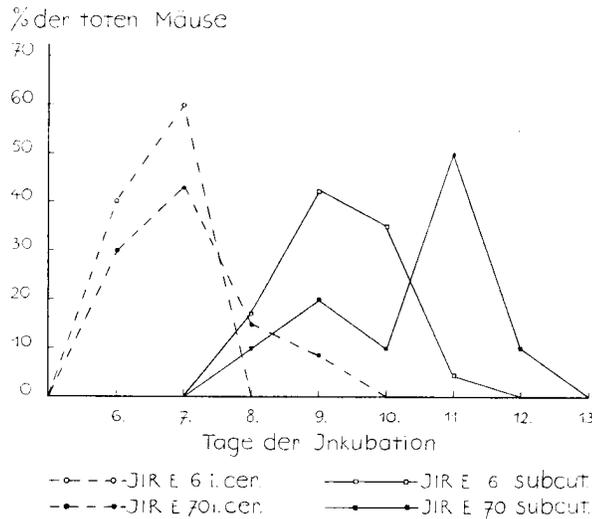


Abb. 4

Virus des Louping-ill und der russischen Frühling-Sommer-Enzephalitis des östlichen Typus auf dem Hühnerembryo

Beide Virusarten von den Mäusepassagen adaptieren sich unmittelbar an die Chorioallantois der Hühnerembryonen. Sie bilden hier auch winzige Herde unter gleichen Bedingungen wie die Virusarten der T.Z.E. und haben nach

Das Virus der tschechoslowakischen Zeckenencephalitis

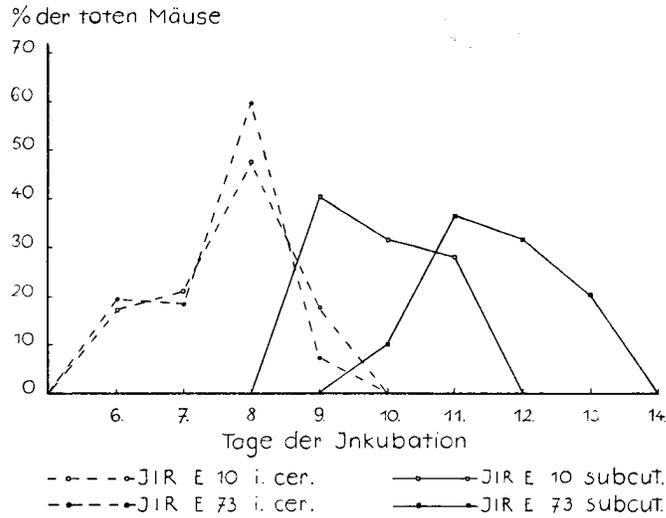


Abb. 5

Tabelle 6

JIR E 6 i.cer. 20 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	40	60	0	0	0	0	0	0	0
JIR E 70 i.cer. 14 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	29	43	14	7	0	7	0	0	0
JIR E 6 subkut. 23 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	0	0	17	44	35	4	0	0	0
JIR E 70 subkut. 20 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	0	0	10	20	10	50	10	0	0

Tabelle 7

JIR E 10 i.cer. 19 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	16	21	47	16	0	0	0	0	0
JIR E 73 i.cer. 17 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	17	18	59	6	0	0	0	0	0
JIR E 10 subkut. 22 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	0	0	0	41	32	27	0	0	0
JIR E 73 subkut. 19 Mäuse										
Tage der Inkubation . . .	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Prozent der toten Mäuse . .	0	0	0	0	0	10	37	32	21	0

dieser Einimpfung keine regelmäßige letale Wirkung auf die Embryonen. Am 3. Tage nach Einimpfung kann man beide Virusarten (durch intrazerebrale Inokulation der Mäuse (in der ganzen Chorioallantois, im Embryo selbst, im Dottersack und in der allantoischen und amniotischen Flüssigkeit nachweisen. In der Chorioallantois wurden die LD-50-Werte für Louping-ill (E_4) $10^{-7,0}$ und für russische Frühling-Sommer-Enzephalitis (E_4) $10^{-7,33}$ ermittelt. Bei Inokulation in den Dottersack üben beide Virusarten eine gleichmäßige letale Wirkung auf das Embryo aus.

Zusammenfassung

1. Die Viren der T.Z.E., Stamm HA und Stamm JIR, adaptieren sich unmittelbar von der Mausgehirmpassage auf den Hühnerembryo, verbreiten sich schnell in allen Geweben innerhalb der Schale und vermehren sich in ihnen.
2. Nach der Impfung auf die Chorioallantois bilden sich hier winzige Herde; in der Chorioallantois erzielen die Viren den höchsten Titer ($10^{6,5}$ bis $10^{7,5}$ LD 50/0,03 ml intrazerebral für die Maus) am dritten Tage, im Embryo ($10^{5,0}$ bis $10^{6,0}$ LD 50/0,03 ml intrazerebral für die Maus) vom vierten Tage nach der Inokulation. In der Regel werden die Embryonen nicht getötet, ihre Entwicklung ist jedoch verlangsamt, so daß die infizierten Hühnerembryonen niemals ausschlüpfen; sie sterben in der Schale ab.
3. Nach Impfung in den Dottersack, bei Benützung junger, 6–8-tägiger Embryonen, tötet das Virus vollkommen regelmäßig die Embryonen ab, meistens am vierten bis siebenten Inkubationstage. Die größte Vermehrung erreicht das Virus im Embryo gewöhnlich am dritten Tage nach der Inokulation ($10^{6,5}$ bis $10^{7,5}$ LD 50/0,03 ml intrazerebral für die Maus).
4. Nach Einimpfung in die Allantoishöhle hat das Virus eine letale Wirkung auf die Embryonen, welche aber weniger einheitlich absterben als nach der Impfung in den Dottersack, und zwar am vierten bis zehnten Tage nach der Infektion. Den höchsten Titer in der Chorioallantois erzielt das Virus vom vierten Tage nach der Inokulation ($10^{6,25}$ LD 50/0,03 ml intrazerebral für die Maus), im Embryo vom dritten Tage ($10^{5,35}$ LD 50/0,03 ml intrazerebral für die Maus); in der Allantoisflüssigkeit befindet sich das Virus in relativ niedrigem, während der Inkubation konstanten Titer ($10^{4,0}$ LD 50/0,03 ml intrazerebral für die Maus).
5. Im intrazerebralen Test an weißen Mäusen wiesen wir keine Veränderungen der antigenen Qualität des Virus der T.Z.E. Stamm JIR nach 60 Passagen auf der Chorioallantois nach.
6. Nach 70 Passagen auf der Chorioallantois kam es zu einer bestimmten Erniedrigung der Invasivität des Virus (Stamm JIR) nachweisbar bei der subkutanen Inokulation von Mäusen. Die Veränderung der Invasivität äußert sich durch Verlängerung der Inkubationszeit der Enzephalitis im Vergleich mit den Resultaten der Kontrollversuche.
7. Die Virusarten der russischen Frühling-Sommer-Enzephalitis und des Louping-ill adaptieren sich ebenfalls unmittelbar auf die Chorioallantois, bilden hier winzige Herde, verbreiten sich im ganzen Gewebesystem des Embryo; bei diesem Infektionsmodus sterben die Embryonen nicht regelmäßig ab. In der Chorioallantois erzielen sie praktisch dieselben Titer wie das Virus der T.Z.E., diese Viren sind ebenfalls letal für die Hühnerembryonen nach der Impfung in den Dottersack.

Summary

The Virus of the Czecho-Slovakian Tick-Encephalitis in the Chick-Embryo.

The author observes quantitatively the augmentation of the virus of the Czecho-Slovakian tick-encephalitis in the incubated egg, following inoculation on the chorio-allantoic membrane, in the allantoic cavity and in the yolk-bag. After 70 transfers on the chorio-allantois the invasivity of the virus was lowered, which could be demonstrated by a prolongation of the incubation-period of the encephal-

litis following subcutaneous inoculation of the adapted virus in albino mice. No alteration of the antigenic quality of the virus in the intracerebral test with albino mice could be demonstrated after 60 transfers on the chorio-allantoic membrane.

As far as the viruses of the Russian spring-summer encephalitis and of the Scottish louping-ill had also been examined, there were no differences between these and the viruses of the Czecho-Slovakian tick-encephalitis.

Résumé

Le virus de l'encéphalite à tiques en Tchécoslovaquie dans l'embryon de poule.

L'auteur observe la multiplication du virus de l'encéphalite à tiques en Tchécoslovaquie dans l'oeuf de poule incubé après avoir infecté la membrane chorio-allantoïque, la cavité allantoïque et le sac vitellin. Après 70 passages sur la membrane chorio-allantoïque le pouvoir d'invasion des virus avait diminué. Ceci s'est manifesté par une période prolongée d'incubation de l'encéphalite chez la souris blanche infectée par inoculation sous-cutanée du virus adapté.

Après 60 passages sur la membrane chorio-allantoïque on n'a pu mettre en évidence aucune altération de la qualité antigénique des virus dans le test intracérébral sur la souris blanche.

En tant qu'on a examiné aussi les virus de l'encéphalite de printemps et d'été en Russie et de l'encéphalite dans l'Ecosse (louping ill) il n'y avait pas de différences entre ces virus et les virus de l'encéphalite à tiques en Tchécoslovaquie.

Вирус чехословацкого клещевого энцефалита в курином зародыше.

Димитрий Слоним

Автор количественно исследует размножение вируса чехословацкого клещевого энцефалита в инкубированном курином зародыше после прививки его на хориоаллантоис, в аллантоисную полость и в желточный мешок. После 70 пассажей на хориоаллантоисе получилось уменьшение инвазивности вируса, выражающееся более длительным инкубационным периодом энцефалита после подкожного введения адаптированного вируса у белых мышей.

После 60 пассажей на хориоаллантоисе у белых мышей внутримозговым тестом не обнаружены изменения антигенных свойств вируса.

Поскольку изучались также и вирусы русского весенне-летнего энцефалита и шотландского энцефалита (вертячки овец, лупинг ил), различий между этими вирусами и вирусом чехословацкого клещевого энцефалита не было.

Schrifttum

1. GALLIA, F., RAMPAS, J. und HOLLENDER, L.: Časopis lék. českých, 88, 224, 1949. — 2. KREJČÍ, J.: Lékař. listy, 4, 73, 1949. — 3. JANDÁSEK, L., PEŠEK, J., POSPÍŠIL, L.: Lékař. listy, 9, 388, 1954. — 4. BARDOŠ, V., ŠOMODSKA, V., und FISCHER, J.: Čsl. Hygiēna, Epidemiologie, Mikrobiologie, 3, 105, 1954. — 5. REED, J. L. und MUENCH, H.: Amer. J. Hyg., 27, 493, 1938. — 6. SLONIM, D.: Čsl. Hygiēna, Epidemiologie, Mikrobiologie, 4, 40, 1955.

Dr. Dimitrij Slonim, Praha (Tschechosl.), Institut für med. Mikrobiologie und Immunologie der med. Fakultät der Karls-Universität.